審 査 の 結 果 の 要 旨

氏　　名　　河野 正樹

これまでに、cyclodextrin (CD) や cyclic α-nigerosyl-(1→6)-nigerose (CNN) など環状オリゴ糖の代謝経路の存在が明らかとなっている。そして、*Arthrobacter globiformis* M6 においても新規な環状四糖、環状 α-1,6-マルトシルマルトース (cyclic α-Maltosyl-(1→6)-Maltose: CMM) を生成および分解する酵素がそれぞれ発見された。さらに、CMM 関連遺伝子クラスターがクローニングされ、CMM 代謝経路の存在が示唆された。CMM 生成および分解酵素の酵素学的な特徴は示されていたが、その立体構造が明らかとなっていないため詳細な分子メカニズムは未知のままであった。また、取り込みに関わると考えられる遺伝子については機能さえも調べられていなかった。本論文は CMM 代謝経路に関わる一連の酵素・タンパク質群の構造解析を行うことで、その代謝経路の存在意義および機能を解明することを目的としており、3 章から構成される。

第 1 章では CMM 生成酵素である 6-α-maltosyltransferase (6MT) の大量発現系の構築について述べている。6MT のように、1 つの酵素のみで 2 段階の転移反応を行うことにより環状糖を生成する例は珍しく、立体構造が明らかとなり、その分子メカニズムが解明されることは意義深い。構造解析において、結晶作製のためには多くのタンパク質が必要となるが、6MT は *A. globiformis* M6 から培養液 1 L あたり 0.96 mg しか得ることができていない。そこで、最も簡便かつ一般的に用いられている *Escherichia coli* を宿主とした発現系での構築に取り組んだが、可溶性および安定性が悪く、ほとんど 6MT を得ることができなかった。次に、*Pichia pastoris* を宿主とした発現系での構築に取り組み、安定的かつ活性を示す 6MT を、培養上清 200 ml あたり約 4.4 mg と充分量得ることに成功した。この発現系を用いることで、6MT の結晶化およびその後の構造解析が可能になった。

第 2 章では CMM 分解酵素である CMM hydrolase (CMMase) の構造および変異解析による分子メカニズムの解明について述べている。特殊な構造の CMM やその中間分解産物であるマルトシルマルトース (MM) を特異的に分解する CMMase の分子メカニズムは非常に興味深い。まず、X 線回折実験により、リガンドフリー状態および各リガンド複合体の結晶構造を決定した。CMMase はサイズ排除クロマトグラフィーにより溶液中においても二量体を形成すると予測された。結晶構造中においても、これまでに Glycoside Hydrolase (GH) family 13

に見られなかったユニークな羽状の二量体構造を形成していた。単量体は α-amylase 関連酵素のコア構造と同様に A、B、C の三つのドメインから構成されており、触媒ドメインであるドメイン A は $(\beta/\alpha)_8$-barrel 構造を取っていた。そして、この単量体構造は、CMMase と配列相同性が顕著に高く、同じ GH13_20 サブファミリーであるが CMM には作用しないネオプルラナーゼ (NPL) とよく似た主鎖構造を有していた。また、CMMase および NPL に基質が結合した複合体構造の比較から、活性部位もよく似ていることがわかった。しかし、特徴的な違いとして、NPL におけるサブサイト−1 および+1 周辺残基の ANE (A330, N331, E332)、サブサイト−3 周辺残基の FA (F289, A290)、 Q (Q294) が CMMase においては PYF (P203, Y204, F205)、CS (C163, S164)、Y (Y168) に置き換わっていた。ANE が PYF に変わることによって、触媒ポケットの奥行きがなくなり、疎水性度も高くなっていた。また、Q が Y に変わることによってポケット手前に立体障害が生まれ、逆に FA が CS に変わることによってポケットの幅が広がっていた。つまり、これらの変異は触媒ポケットを CMM がフィットするような形状に変化させ、NPL とは異なった位置にサブサイト+1 および−3 を形成させていることが示唆された。これらの残基の変異解析を行ったところ、それぞれ一部分の変異は活性には大きな影響を与えなかったが、複数部位の変異によって著しい活性の低下を示した。以上の結果から、CMMase の CMM に対する特異性は複数残基による複合的な作用によってもたらされていることが示唆された。

第 3 章では ABC トランスポーター輸送に関わると推定され、CMM-binding protein (CMMBP) と名付けられた sugar-binding protein の機能および構造解析について述べている。まず、機能解析により CMMBP は CMM を特異的かつ非常に高い結合定数(K_a)で結合する sugar-binding protein であることを明らかにした。そして、X 線結晶構造解析により MM が結合した CMMBP の複合体構造を明らかにした。CMMBP の構造は、その他の sugar-binding protein と同様に N-および C-ドメインの 2 つの α/β ドメインから構成されていた。CD に結合性を示す sugar-binding protein と全体構造はよく似ていたが、クレフト部分におけるリガンド結合様式は異なっていた。一方、CMMBP は、CNN に結合性を示す sugar-binding protein と全体構造やリガンド様式に一部類似性が見られた。結合した MM 構造を基に CMM のモデリングを行うことで、open-closed メカニズムを推測した。その結果、CMMBP が closed 状態へ移行するためには、今回電子密度が明瞭ではなかった MM の非還元末端グルコース残基位置の重要性が示唆された。そして、CMM が結合した時のみ、この位置におけるグルコース残基が N-ドメインと相互作用できるため、closed 状態へ移行できると推測された。

以上、本論文は、新規な環状糖である CMM の代謝経路を初めて詳細に明らかにしたものであり、これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。